

بررسی هیستوپاتولوژیک تأثیرات حاد نانو ذرات نقره بر کبد و کلیه و تغییرات سلول‌های خونی طی درمان خوراکی در جنس نر موش سفید آزمایشگاهی

رویا جعفرزاده سامانی^۱، محمد سعید حیدر نژاد^{۱*}، محسن کبیری سامانی^۲

^۱گروه زیست شناسی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ ^۲گروه بیولوژی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ ^۳گروه بیماری‌های داخلی،

دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۱۸

چکیده:

زمینه و هدف: امروزه با افزایش استفاده از نانو ذرات نقره در محصولات مختلف از جمله محصولات مصرفی و پزشکی، بررسی سمیت نانو ذرات نقره، برای امنیت استفاده‌کنندگان از این محصولات، لازم و ضروری می‌باشد. این مطالعه با هدف بررسی اثر خوراکی نانو ذرات نقره بر بافت کبد، کلیه و بررسی تغییرات در سلول‌های خونی در موش سفید آزمایشگاهی طراحی و اجرا شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ۴۵ سر موش نر (Balb/c با وزن 24 ± 3 گرم) به طور تصادفی در ۳ گروه ۱۵ تایی (تیمار ۱ و تیمار ۲ و کنترل) مورد بررسی قرار گرفتند. درمان خوراکی با نانو نقره روزانه در گروه تیمار ۱ با محلول ۲۰ ppm و برای گروه تیمار ۲ با ۵۰ ppm و گروه کنترل با همان مقدار آب مقطر تیمار شد. در روزهای ۲ و ۷ و ۱۴ نمونه‌گیری بافت از کبد و کلیه انجام و بررسی‌های بافت‌شناسی نیز با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و انوزین صورت گرفت.

یافته‌ها: آسیب‌های وارد شده به کبد، منجر به واکنش شدن سیتوپلاسم سلول‌های کبدی همراه با دژنراسیون و نکروز برخی سلول‌ها و تجمع کانونی سلول‌های آماسی در کبد همراه با پرخونی می‌شود. آسیب‌های وارد شده به کلیه در موش‌های دریافت‌کننده نانو ذرات نقره شامل پرخونی، حضور سلول‌های آماسی، نکروز سلول‌های توبولی و گلوMERONFRIT کلیه می‌باشد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که استفاده از نانو ذرات نقره در دوز بالاتر (۵۰ ppm) باعث افزایش شدت ضایعات در بافت کبد و کلیه می‌شود. در بررسی شمارش گلبول‌های قرمز و اندازه‌گیری هموگلوبین و هماتوکریت تفاوت معنی‌داری میان گروه تیمار و کنترل مشاهده نشد ($P > 0.05$)؛ اما تعداد گلبول‌های سفید در گروه تیمار (غلظت ۵۰ ppm) نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: این آزمایشات نشان داد که کبد و کلیه بافت هدف برای نانو ذرات نقره می‌باشند و استفاده از نانو ذرات نقره به صورت خوراکی باعث آسیب بافت کبد و کلیه موش‌ها می‌شود و همچنین درمان خوراکی نانو ذرات نقره باعث تغییرات قابل توجهی در تعداد گلبول‌های سفید خون می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: نانو ذرات نقره، هیستولوژی، بافت کبد، بافت کلیه، سلول‌های خون.

مقدمه:

می‌باشند (۳). نانو ذرات، با اندازه و غلظت متفاوت دارای توزیع و اثر متفاوتی در بافت‌های بدن هستند (۴). گزارش شده است که نانو ذرات نقره کوچک‌تر نسبت به نانو ذرات بزرگ‌تر سمیت بیشتری ایجاد می‌کنند (۵). نقره در محدوده نانومتر، به علت خاصیت ضد باکتری و ضد قارچ مورد استفاده قرار گرفته است (۶)؛ بنابراین در بسیاری

نانو ذرات نقره، یکی از گسترده‌ترین مواد به کار رفته در محصولات مصرفی است (۱). نانو ذرات، ذراتی پراکنده شده و یا جامد با اندازه‌ای در محدوده ۱۰۰-۱۰ نانومتر می‌باشند (۲). مطالعات صورت گرفته هم در شرایط آزمایشگاهی و هم در محیط زنده نشان می‌دهند که نانو ذرات نقره دارای اثرات سیتوتوکسیک و ایمونوتوکسیک

*نویسنده مسئول: شهرکرد- دانشگاه شهرکرد- گروه زیست شناسی- تلفن: ۰۹۱۷۳۰۸۳۸۱۰، E-mail: m_heydarnejad@yahoo.com

از دستگاه‌های شستشو، دستگاه‌های تهویه مطبوع و یخچال‌ها و نیز در تهیه لباس ورزشی، اسباب بازی‌ها، وسایل کودکان، ظروف ذخیره غذا، برچسب‌های زیستی و عوامل ضد میکروبی استفاده شده است. در زمینه پزشکی در تهیه محصولات محلولاتی مانند دریچه‌های قلب، ماسک طبی، پمادهای زخم و بانداژ از نانو ذرات نقره استفاده می‌گردد (۷). بر اساس مطالعات صورت گرفته عوارض جانبی ایجاد شده در سلول‌های انسان در معرض نانو ذرات، ممکن است به علت تولید رادیکال‌های آزاد و گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) باشد که سبب آسیب درون سلولی می‌شوند (۸)؛ همچنین، یون‌های نقره می‌توانند از طریق تعامل با گروه‌های تیول غشاء داخلی میتوکندری، سبب آسیب میتوکندری شوند، به‌طوری که این اثرات یون‌های نقره، می‌توانند توسط معرف‌های سولفیدریل مانند گلووتاتیون احیاء شده مهار شوند (۹). مشخص شده است که یون‌های نقره با اتصال به گلووتاتیون احیاء شده سبب کاهش آن می‌شوند، در حالی که گلووتاتیون احیاء شده نقش مهمی در حفظ ساختار و عملکرد مناسب سلول‌های خونی و نیز از بین بردن پراکسیدهای آلی دارند (۱۰). در یک مطالعه تنفسی بر روی نانو ذرات نقره ۱۵ nm، مشخص شد که نانو ذرات نقره در خون تجمع می‌یابند و سپس به اندام‌هایی مانند کبد، کلیه، قلب، گره‌های لنفاوی و مغز منتشر می‌شوند (۱۱، ۱۲). نانو ذرات نقره به‌عنوان سمی برای سلول‌های پستانداران، ریه، کبد، کلیه، مغز و سایر اندام‌ها شناسایی شده است (۱۳).

در سلول‌های در معرض نانو ذرات نقره ۱۵ nm در مقایسه با ذرات نقره ۵۵ nm بیش از ده بار افزایش در سطح ROS مشاهده شد که این نشان می‌دهد، سمیت نقره به‌واسطه استرس اکسیداتیو و اندازه می‌باشد که یکی از مهم ترین مراحل ایجاد سمیت است (۱۴). مکانیسم سمیت نقره به علت تبدیل نانو ذرات نقره به یون‌های نقره فعال می‌باشد که در نتیجه سبب از بین رفتن سلول‌ها می‌شوند (۱۵). نانو ذرات نقره باعث سمیت کبد و کلیه می‌شوند و دوز بالای آن منجر به مرگ می‌شود. نانو

ذرات نقره، همچنین باعث تغییرات هیستوپاتولوژیکال در کبد و کلیه و طحال می‌گردد که تمایل یون‌های نقره برای اتصال به گروه‌های تیول (thiol) در کبد را نشان می‌دهد (۱۶).

مطالعات متفاوت نشان می‌دهد که بافت‌های کبد، کلیه، شش در رت‌های در معرض نانو ذرات (۵۰ نانومتر) از طریق تزریق داخل وریدی باعث آسیب‌هایی بر بافت کبد و کلیه این موجودات می‌شود (۱۷).

در مطالعه‌ای، اثرات سمیت نانو ذرات نقره در اندازه‌های متفاوت از طریق خوراکی بر موش‌ها مورد بررسی قرار گرفت. وقتی موش در معرض نانو ذرات نقره قرار گرفتند، این مواد به گردش خون راه یافته و در اندام‌هایی نظیر کلیه، کبد، طحال، مغز و ریه توزیع می‌شوند (۱۸). مسیر خوراکی یا دستگاه گوارش یک مسیر مهم و عمده برای جذب نانو ذرات می‌باشد، این امر به دلیل کاربردهای متنوع نانو ذرات نقره در محصولات مصرفی از جمله کاربرد آن‌ها در صنایع غذایی و بسته بندی مواد غذایی می‌باشد (۱۹، ۲۰).

نظر به اینکه نانو ذرات نقره می‌توانند به‌طور مستقیم بر روی فعالیت طبیعی سلول‌های بدن تأثیر بگذارند و باعث اختلال در عملکرد اندام‌های بدن شوند (۲۱)؛ لذا تعیین سمیت آن‌ها در محیط زنده از اهمیت خاصی برخوردار است؛ بنابراین، در مطالعه حاضر اثر حاد نانو ذرات نقره بر روی سلول‌های خونی، بافت کبد و بافت کلیه (در دو دوز) مورد بررسی قرار گرفت.

ضمناً گرچه برخی مطالعات همچون Park و همکاران (۲۲) به بررسی تأثیر نانو ذرات نقره بر موش پرداختند؛ اما این محققین پاسخ‌های التهابی از جمله سنجش فاکتورهای التهابی مثل سیتوکین‌ها و TGF- β را اندازه گرفتند و یا Korani و همکاران (۱) تأثیر پوستی نانو ذرات نقره را بر خوکیچه هندی مورد بررسی قرار دادند. بهمین دلیل این مطالعه از این جهت انجام گردید که به طور اختصاصی تأثیر حاد

نانو ذرات نقره که منحصراً در محدوده ۱۰-۵۰ ppm می باشد (۲۴،۲۳). بر آسیب بافتی دو اندام اصلی تجمع این ذرات یعنی کبد و کلیه موش به موازات تغییرات خونی را بررسی نماید.

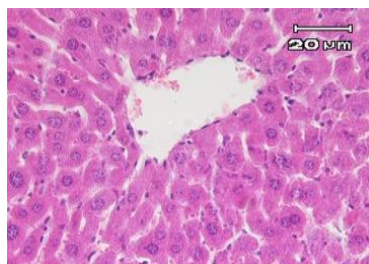
روش بررسی:

در این مطالعه تجربی نانو ذرات نقره مصرفی به صورت کلوییدی ۴۰۰۰ ذره در میلیون (ppm) و ساخت شرکت نانو ابزار پارس مورد استفاده قرار گرفت. برای تیمار حیوانات محلول ۲۰ ppm و ۵۰ ppm با آب مقطر رقیق شد. تعداد ۴۵ سر موش نر سفید نژاد Balb/c، دارای وزن ۲۵-۳۰ گرم از حیوانخانه دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد خریداری گردید و در شرایط دما و رطوبت مناسب و سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. در بستر قفس ها خاک اره قرار داشت. تغذیه حیوانات از طریق گلوله ها و پلیت های مخصوص حیوانات آزمایشگاهی صورت می گرفت و در این مدت آب کافی در دسترس حیوانات قرار داشت و آب در دسترس به منظور جلوگیری از آلوده شدن و رعایت بهداشت روزانه تعویض می شد. برای اطمینان از عدم وجود هرگونه عفونت در بدن به دقت معاینه شدند. حیوانات به صورت تصادفی به سه گروه (هر گروه ۱۵ سر موش) شامل دو گروه تیمار و یک گروه کنترل تقسیم شدند. گروه تیمار یک- حیوانات این گروه، از روز آغاز تیمار یکبار در روز در زمان مشخصی میزان ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانو ذرات نقره دریافت نمودند. گروه تیمار دو- حیوانات این گروه، از روز آغاز تیمار یکبار در روز در زمان مشخصی میزان ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانو ذرات نقره دریافت نمودند. گروه کنترل- حیوانات این گروه، از روز آغاز تیمار یکبار در روز آب مقطر دریافت نمودند. هر سه گروه به مدت ۱۴ روز تحت تیمار قرار گرفتند. بعد از طی نمودن دوره تیمار، در روزهای متناوب ۷،۲ و ۱۴ حیوانات با ماده بیهوشی که ترکیبی از ۱۰ میلی لیتر کتامین، ۰/۵ میلی لیتر آسپارمازین، ۲ میلی لیتر دیازپام و کمتر از ۰/۵ میلی لیتر زایلازین بود؛ با تزریق عضلانی بی هوش

شدند. در ادامه نمونه های بافتی کبد و کلیه از بدن حیوانات خارج و به طور جداگانه درون فرمالین ۱۰٪ قرار داده شدند. به منظور نفوذ بهتر و بیشتر فرمالین به درون بافت، محلول فرمالین هر ۲۴ ساعت تعویض شد. از هر یک از نمونه های بافتی، مقاطعی برداشته و طی مراحل آبگیری، شفاف سازی پارافینه کردن، قالب گیری و تهیه ی برش های بافتی، توسط دستگاه میکروتوم، با ضخامت ۵ میکرومتر صورت گرفت و در ادامه رنگ آمیزی از همتاکسیلین- ائوزین استفاده می شود و پس از آماده کردن اسلایدهای پاتولوژی، جهت مطالعه با میکروسکوپ نوری بررسی شدند. برای تجزیه و تحلیل اطلاعات با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گرفت و سطح $P < 0.05$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد. جهت بررسی سلول های خونی پس از گذشت ۱۴ روز حیوانات را با ماده بیهوشی ذکر شده بیهوش کرده، عمل خونگیری به طور مستقیم از قلب آن ها برای سنجش فاکتورها و سلول های خونی صورت گرفت. نمونه ها به صورت خون کامل تهیه شد. پارامترهای خونی توسط دستگاه آنالایزر همتاتولوژی (ساخت کمپانی sysmex مدل KX-N) اندازه گیری شد. نتایج به دست آمده به صورت میانگین \pm انحراف معیار نمایش داده شدند. برای مقایسه میانگین داده ها از آزمون t مستقل استفاده گردید. نتایج با استفاده از آزمون تی (t-test) و نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

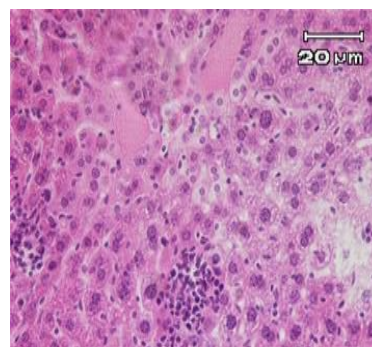
یافته ها:

در گروه کنترل، سلول های کبدی دارای سیتوپلاسم صورتی یکنواخت و هسته های بزرگ و یوکروماتیک می باشند که به صورت شعاعی در اطراف سیاهرگ مرکزی لوپولی آرایش یافته اند (تصویر شماره ۱).

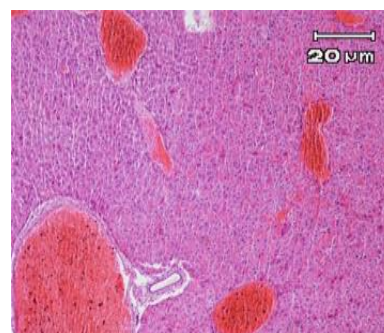


تصویر شماره ۱: بافت طبیعی کبد

در گروه تیمار، در روز دوم، گرانوله شدن سیتوپلاسم سلول‌های کبدی همراه با تجمع کانونی سلول‌های آماسی مشاهده شد (تصویر شماره ۲). در روز ۷ پرخونی شدید در بافت کبد و تجمع خون در عروق ناحیه ی پورتال، سیاهرگ‌های مرکز لوبولی و سینوزوئیدهای کبدی مشاهده شد (تصویر شماره ۳).

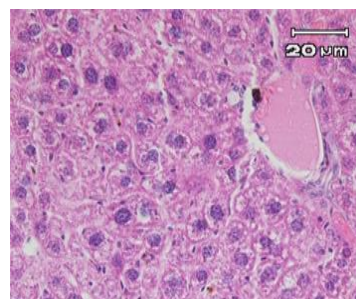


تصویر شماره ۲: دژنراسیون سلول کبدی



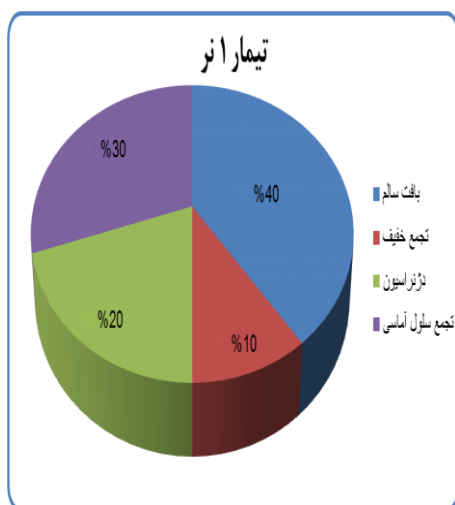
تصویر شماره ۳: پرخونی شدید کبد

مطالعات هیستوپاتولوژیک بافت کبد در گروه تیمار در روز ۱۴، نشان‌دهنده‌ی، واکوئله شدن شدید سیتوپلاسم سلول‌های کبدی همراه با دژنراسیون و نکروز برخی سلول‌های کبدی می‌باشد (تصویر شماره ۴).

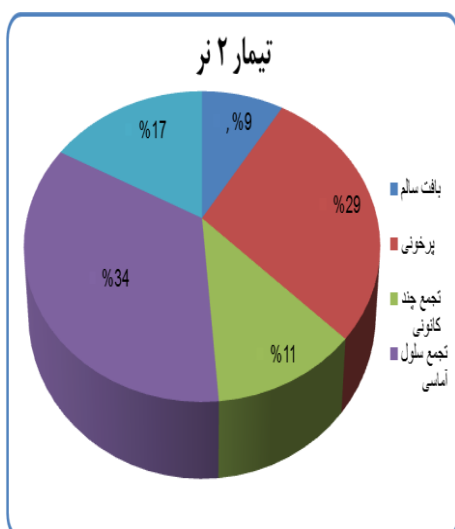


تصویر شماره ۴: واکوئله شدن شدید سیتوپلاسم همراه با دژنراسیون و نکروز سلول‌های کبدی

بررسی بافت کبد در موش‌های در معرض نانو ذرات نقره نشان می‌دهد که در دوز پایین نانو ذرات نقره، آسیب بافتی کمتری مشاهده می‌شود. دوزهای بالای نانو ذرات نقره بر بافت کبد بیشتر تأثیر داشته است و به عبارت دیگر، اثر نانو ذرات نقره بر بافت کبد به صورت وابسته به دوز است و با افزایش دوز نانو ذرات نقره آسیب‌های وارد شده به کبد نیز بیشتر می‌شود (نمودار شماره ۱ و ۲).

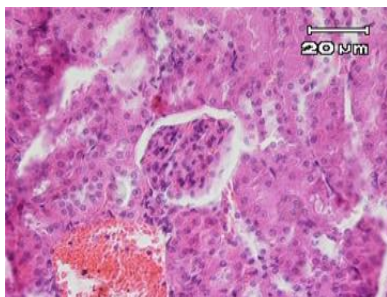


نمودار شماره ۱: اثر نانو ذرات نقره ppm ۲۰ بر بافت کبد



نمودار شماره ۲: اثر نانو ذرات نقره ppm ۵۰ بر بافت کبد

بافت کلیه در گروه کنترل سالم می‌باشد، غشای گلومرولی، کپسول بومن و قسمت‌های مختلف مجاری کلیوی سالم و نرمال می‌باشد (تصویر شماره ۵).



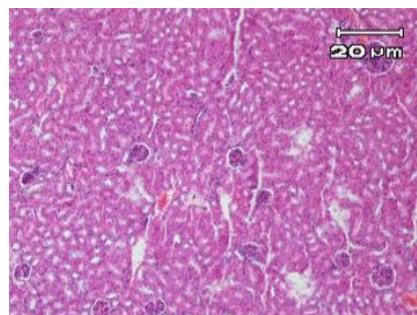
تصویر شماره ۸: تورم سلول های پوششی دیواره لوله های ادراری پروگزیمال و محو شدن لومن

بررسی بافت کلیه در موش های در معرض نانو ذرات نقره نشان می دهد که در دوز پایین نانو ذرات نقره، آسیب بافتی کمتری ایجاد می کند. بررسی های بافت شناسی کلیه نشان می دهد که دوزهای بالای نانو ذرات نقره بر بافت کلیه بیشتر تأثیر داشته است و سبب تورم سلولی و تخریب لوله ها می شود (تصویر شماره ۸ و نمودار شماره ۳).



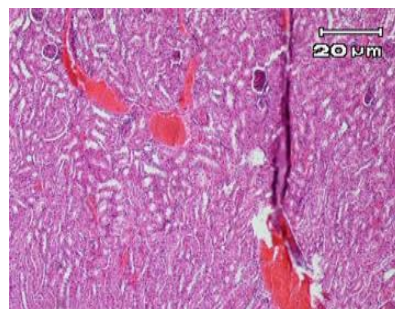
نمودار شماره ۳: اثر نانو ذرات نقره ۵۰ ppm بر بافت کلیه

در بررسی شمارش گلبول های قرمز و اندازه گیری میانگین حجم هر گلبول قرمز (PCV)، هموگلوبین (Hb)، تفاوت معنی داری میان گروه تیمار و کنترل مشاهده نشد (جدول شماره ۱)؛ اما میانگین تعداد گلبول های سفید در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل در روز چهاردهم افزایش معنی داری نشان داد ($P=0/02$). نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده است.

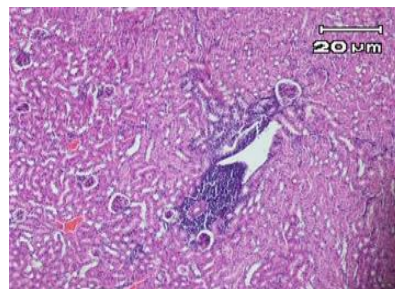


تصویر شماره ۵: بافت طبیعی کلیه

بافت کلیه در گروه تیمار مورد تهاجم سلول های آماسی قرار گرفته است. پر خونی در بافت کلیه و در گلومرول های کلیه مشاهده می شود (تصویر شماره ۶)؛ همچنین تجمع سلول های آماسی تک هسته ای در بافت بینابینی اطراف لوله های ادراری و بافت همبند اطراف گلومرول ها، همراه با تخریب لوله ها مشاهده می شود (تصویر شماره ۷). مطالعات هیستوپاتولوژیک بافت کلیه در گروه تیمار نشان دهنده ی تورم سلول های پوششی دیواره لوله های ادراری پروگزیمال و محو شدن لومن می باشد (تصویر شماره ۸).



تصویر شماره ۶: پر خونی بافت کلیه



تصویر شماره ۷: تجمع سلول های آماسی در بافت همبند اطراف گلومرول ها همراه با تخریب لوله ها

جدول شماره ۱: برخی پارامترهای خونی در گروه کنترل و تیمار بعد از گذشت چهارده روز از شروع مطالعه

گروه‌ها	میانگین حجم گلبول قرمز (pcv)	تعداد گلبول سفید (wbc)	تعداد گلبول قرمز (Rbc)	هموگلوبین (Hb)
شاهد	۴۲/۵±۳/۰۵	۷/۲±۱/۰۴	۷±۱	۱۳/۲±۱/۲۷
۵۰ ppm	۴۶/۳±۶/۰۳	۹/۸±۰/۷۶	۶/۸۲±۲/۰۲	۱۳±۲/۹

هر داده به صورت میانگین \pm انحراف معیار نمایش داده شده است. تفاوت معنی داری میان پارامترهای خونی گروه تیمار و کنترل وجود نداشت ($P < 0/05$).

بحث:

در چندین مطالعه بر روی موش‌های صحرایی، تغییرات هماتولوژیک خون، بعد از مصرف خوراکی، استنشاق و نیز تزریق درون وریدی نانو ذرات نقره مورد بررسی قرار گرفت. Kim و همکاران بعد از مصرف خوراکی نانو ذرات نقره با اندازه ۶۰ نانومتر به مدت ۲۸ روز گزارش دادند که هیچ اختلاف آماری قابل توجهی در اغلب پارامترهای خونی گروه تیمار در مقایسه با گروه کنترل وجود ندارد (۲۵). به علاوه در بررسی فاکتورهای خونی پس از مصرف خوراکی نانو ذرات نقره با اندازه حدود ۱۰-۲۰ نانومتر و با غلظت ۵۰۰۰ mg/kg (۲۶) و نیز استنشاق غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره در زمان‌های متفاوت نتایج مشابهی گزارش شده است (۲۷). گزارش گردیده است که نانو ذرات نقره از طریق استرس اکسیداتیو درون سلولی می‌توانند به سلول‌ها آسیب بزنند (۲۸، ۲۹). لازم به ذکر است که به علت وجود آنتی‌اکسیدان‌ها در پلاسما خون مانند ویتامین C در فاز آبی و ویتامین E محلول در تری گلیسرید غنی از لیپوپروتئین‌ها در جریان خون، سلول‌ها در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد محافظت می‌شوند و زمانی که یک موجود زنده بیش از حد در معرض اکسیدان‌ها قرار بگیرد، توانایی آنتی‌اکسیدانی پلاسما خون دچار مشکل شده و ممکن است، این توانایی کاهش یابد (۳۰). گزارش شده است بعد از تزریق درون وریدی غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره به موش‌های صحرایی، تغییرات قابل توجهی در پارامترهای خونی در غلظت‌های بیشتر از ۲۰ mg/kg

مشاهده گردید (۳۱) که می‌توان علت آن را ورود مقدار بیشتر این نانو ذرات به خون دانست. البته پروتئین‌های پلاسما نیز می‌توانند بر روی توزیع، حذف و سمیت نانو ذرات نقره اثر بگذارند (۳۲). در مطالعه حاضر، افزایش معنی داری در شمارش گلبول‌های سفید گروه تیمار در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد که در توجیه این نتیجه می‌توان گفت احتمالاً علاوه بر نانو ذرات نقره، یون‌های نقره آزاد شده از نانو ذرات، در نتیجه‌ی حاصل مؤثر بوده است؛ چرا که به عنوان مثال در مطالعات فوق پس از مصرف خوراکی نانو ذرات نقره، با اندازه‌های متفاوت، اثر مشابهی بر روی پارامترهای خونی مشاهده شد؛ بنابراین فرضیه پیشنهادی Wijnhoven و همکاران (۴) مبنی بر اینکه سمیت نقره عمدتاً به علت یون‌های نقره آزاد شده می‌باشد، مورد تأیید است که در این مورد یون‌های نقره آزاد شده از نانو ذرات نقره احتمالاً در نتیجه حاصل از مطالعه مؤثر بوده است. البته لازم به ذکر است که نانو ذرات وارد شده به بدن می‌توانند با اجزاء سیستم ایمنی واکنش داده و بر اساس برخی مطالعات، قادرند سبب افزایش سیتوکین‌های مختلف شوند. البته نانو ذرات مختلف ممکن است اثرات متفاوتی بر روی سیستم ایمنی داشته باشند و سبب تحریک یا مهار سیستم ایمنی گردند (۳۳). Kim و همکاران نیز بعد از بررسی سمیت استنشاق نانو ذرات نقره با اندازه ۱۸ نانومتر به مدت ۹۰ روز متوجه شدند که این ذرات سمیت ژنتیکی را در مغز استخوان موش‌های صحرایی

القاء نمی‌نمایند (۱۴)؛ بنابراین بر اساس مطالعات صورت گرفته می‌توان گفت که ورود نانو ذرات نقره و همچنین یون‌های نقره به بدن می‌تواند سبب افزایش تعداد گلبول‌های سفید برای بیگانه‌خواری گردند (۳۴). روشنایی و همکاران نیز اثر نانو ذرات نقره خوراکی بر عوامل خونی، هورمونی و ادراری رت‌های صحرایی نژاد ویستار را بررسی کردند که تغییر معنی‌داری در تعداد گلبول‌های قرمز خون، سطح هموگلوبین و هماتوکریت مشاهده نکردند (۳۵).

تعیین سمیت نانو ذرات در شرایط *in vivo* از اهمیت خاصی برخوردار است. نانو ذرات نقره به طور مستقیم می‌توانند بر روند فعالیت طبیعی سلول‌های بدن تأثیر بگذارند و باعث اختلال در عملکرد اندام‌های بدن شوند (۳۶).

مطالعه‌ی زمانی و همکاران که اثرات نانو ذرات نقره بر بافت کبد را بررسی کردند، نشان داد که نانو ذرات نقره اثرات مخربی را بر بافت کبد القا نموده و باعث نکروز و دژنراسیون بافت کبد همراه با تجمع سلول‌های آماسی می‌شود، می‌توان نتیجه گرفت که نانو ذرات نقره می‌توانند گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و رادیکال‌های آزاد را تولید نموده، تجمع بیش از حد ROS، می‌تواند پاسخ التهابی را آغاز کند و منجر به تخریب میتوکندری شود، در نتیجه سطح (Glutathione Sulfate Hydrogenase= GSH) به دلیل التهاب کاهش می‌یابد؛ بنابراین فاکتورهای آپوپتوز از جمله سیتوکروم C آزاد شده و منجر به مرگ سلولی می‌شوند (۳۷).

در مطالعه‌ای، با افزایش غلظت نانو ذرات نقره در بافت‌های در معرض نانو ذرات، تجمع سلول‌های آماسی، پرخونی و نکروز مشاهده گردید (۲۷). در مطالعه‌ای دیگر سمیت نانو ذرات نقره کلونیدی با غلظت‌های مختلف بر روی خوکچه هندی بررسی گردید، با افزایش غلظت نانو ذرات نقره تخریب هپاتوسیت‌ها و تولید بیش از حد سلول‌های کوپفر

مشاهده شد و نکروز فقط در غلظت‌های بالای نانو ذرات نقره مشاهده گردید (۱).

در مطالعه حاضر، مشاهدات هیستوپاتولوژیک بافت کبد در موش‌های در معرض نانو ذرات نقره (با دو غلظت)، درجات متفاوتی از آسیب بافتی را نشان می‌دهند. این یافته‌ها منطبق با برخی مطالعاتی است که در این زمینه صورت گرفته است.

Kim و همکاران در مطالعه‌ای سمیت نانو ذرات نقره را بر بافت کبد رت‌ها بررسی نمودند. آسیب بافتی وابسته به نانو ذرات نقره در لوبول‌های کبدی، سلول‌های کوپفر و سینوزوئیدها و نیز آماس هپاتوسیت‌ها در بافت کبد مشاهده گردید (۲۸).

در مطالعه‌ای سمیت خوراکی نانو ذرات نقره (۶۰ نانومتر) با دوز ۳۰ mg/kg، ۳۰۰ mg/kg و ۱۰۰۰ mg/kg در طی یک دوره ۲۸ روز در رت‌های نژاد Sprague-Dawley مورد بررسی قرار گرفت. تغییرات قابل توجهی در بیوشیمی سرم خون در گروه تحت درمان با نانو ذرات ۱۰۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم مشاهده شد. تجمع نانو ذرات نقره در بافت‌ها به صورت وابسته به دوز مشاهده شد، تجمع بافتی نانو ذرات نقره در خون، ریه‌ها، کلیه‌ها، مغز و کبد مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعات هیستوپاتولوژیکی دژنراسیون هپاتوسیت‌ها و اتساع سیاهرگ مرکزی مشاهده شد (۲۵).

سرداری و همکاران اثرات سمیت نانو ذرات نقره را در رت‌ها بررسی کردند. مطالعات بافت‌شناسی آماس سلول‌های پارانشیمی در کبد، نسخه‌برداری یا تکثیر هسته در تعدادی از سلول‌ها و توسعه فضای درون سلولی در لوبول‌های کبدی را نشان داد. علاوه بر این، آپوپتوز در اطراف سیاهرگ مرکزی و همچنین خون (پرخونی) در تعدادی از سلول‌ها مشاهده شد (۳۸).

در دیگر مطالعه نیز نانو ذرات نقره ۱ mg/kg در اندازه‌های کوچک (۲۲ nm، ۴۲ nm و ۷۱ nm) به مدت ۱۴ روز به صورت خوراکی تجویز شدند. تجمع نانو ذرات نقره در اندام‌های مختلف از جمله مغز، ریه، کبد، کلیه و

بیضه‌ها مشاهده شد؛ اما نانو ذرات با اندازه‌ی بزرگ‌تر (۳۲۳ nm) تنها در بیضه‌ها مشاهده شدند (۲۲).

در مطالعه‌ای دیگر نانو ذرات نقره ۵ mg/kg در اندازه‌های ۲۰ nm و ۲۰۰ nm به صورت داخل وریدی تزریق شد. تجمع وابسته به زمان نانو ذرات نقره مورد بررسی قرار گرفت. غلظت نقره در بافت های کلیه و مغز در طول آزمایش افزایش یافت که بالاترین غلظت در روز ۲۸ مشاهده شد (۳۹).

نانو ذرات نقره از طریق مکانیسم‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو باعث آسیب DNA در سلول‌های پستانداران می‌شود و به طور قابل توجهی مرگ سلولی را افزایش می‌دهد (۴۰).

Daniel و همکاران توزیع نانو ذرات نقره را در مغز، کلیه، کبد، شش، طحال و قلب تشخیص دادند و بیان کردند که نانو ذرات نقره در کلیه دیده می‌شوند؛ ولی در ادرار نانو ذرات نقره مشاهده نمی‌شوند. چون نانو ذراتی با اندازه بزرگ‌تر (۲۰ نانومتر) توسط فیلتراسیون کلیوی دفع نمی‌شود. فیلتراسیون گلومرولی ذراتی با قطری کمتر از ۸ نانومتر را از خون دفع می‌کنند. با این حال رسوب وابسته به دوز نانو ذرات نقره در کلیه مشاهده شد که نشان می‌دهد نانو ذرات نقره به‌طور سیستمیک در بافت های پستانداران توزیع می‌شود (۴۱).

نتایج این تحقیقات تا حدودی با مطالعه حاضر همخوانی دارند. در مطالعه حاضر نتایج هیستوپاتولوژیک نشان داد که نانو ذرات اثرات تخریبی بر روی بافت کلیه داشت. اثر وارد شده بر روی بافت کلیه شامل آسیب‌هایی مثل پرخونی، تجمع سلول‌های آماسی تک هسته ای در بافت بینابینی اطراف لوله‌های ادراری و بافت همبند

اطراف گلومرول ها همراه با تخریب لوله‌ها و تورم سلول‌های پوششی دیواره لوله‌های ادراری پروگزیمال و محو شدن لومن آن ها و به‌طور کلی نفرت بینابینی دیده می‌شود که با توجه به دوز دارو شدت ضایعات از خفیف تا شدید می‌باشد.

نتیجه‌گیری:

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان می‌دهد که نانوذرات نقره به کار رفته بر روی بافت کبد و کلیه دارای اثرات سمیت می‌باشد. آسیب‌های بافتی وارد شده بر بافت کبد و کلیه با افزایش دوز نانو ذرات نقره بیشتر مشاهده می‌شود. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که نانو ذرات نقره سبب تحریک سیستم ایمنی می‌شوند و باعث افزایش گلبول‌های سفید می‌شود؛ اما بر روی برخی پارامترهای خونی اثری ندارند. البته با بررسی سطح نقره در خون و سنجش بیو مارکرهای استرس اکسیداتیو می‌توان اثرات این نانو ذرات را بهتر توجیه کرد؛ بنابراین این موضوع مطالعات بیشتری را می‌طلبد و پیشنهاد می‌شود اثر آن بر بافت‌ها و اندام‌های دیگر نیز بررسی گردد.

تشکر و قدردانی:

این مقاله بخشی از پایان‌نامه جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد می‌باشد؛ لذا بدین وسیله از کلیه اساتید گرامی و همچنین کارکنان محترم آزمایشگاه فارماکولوژی دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد که ما را در این پژوهش یاری کردند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع:

1. Korani M, Rezayat SM, Gilani K, Arbabi Bidgoli S, Adeli S. Acute and subchronic dermal toxicity of nanosilver in guinea pig. Int J Nanomedicine. 2011; 6: 855-62.
2. Zhang G, Niu A, Peng S, Jiang M, Tu Y, Li M, et al. Formation of novel polymeric nanoparticles. Acc Chem Res. 2001; 34(3): 249-56.
3. Trop M, Novak M, Rodl S, Hellbom B, Kroell W, Goessler W. Silver-coated dressing acticoat caused raised liver enzymes and argyria-like symptoms in burn patient. J Trauma. 2006; 60(3): 648-52.

4. Wijnhoven SW, Peijnenburg WJ, Herberts CA, Hagens WI, Oomen AG, Heugens EH, et al. Nano-silver—a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicol.* 2009; 3(2): 109-38.
5. Fukuoka A, Sakamoto Y, Guan S, Inagaki S, Sugimoto N, Fukushima Y, et al. Novel templating synthesis of necklace-shaped mono- and bimetallic nanowires in hybrid organic-inorganic mesoporous material. *J Am Chem Soc.* 2001; 123(14): 3373-4.
6. Ahmadi F, Kordestany AH. Investigation on silver retention in different organs and oxidative stress enzymes in male broiler fed diet supplemented with powder of nano silver. *Am Eurasian J Toxicol Sci.* 2011; 3: 28-35.
7. Theivasanthi T, Alagar M. Anti-bacterial Studies of Silver Nanoparticles. arXiv preprint arXiv: 1101.0348 2011. Available from: <http://arxiv.org/abs/1101.0348>.
8. Rastogi ID. Nanotechnology: Safety paradigms. *J Toxicol Environ Health.* 2012; 4(1): 1-12.
9. Almofti MR, Ichikawa T, Yamashita K, Terada H, Shinohara Y. Silver ion induces a cyclosporine a-insensitive permeability transition in rat liver mitochondria and release of apoptogenic cytochrome C. *J Biochem.* 2003; 134(1): 43-9.
10. Drake PL, Hazelwood KJ. Exposure-related health effects of silver and silver compounds: A review. *Ann Occup Hyg.* 2005; 49(7): 575-85.
11. Takenaka S, Karg E, Roth C, Schulz H, Ziesenis A, Heinzmann U, et al. Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environ Health Perspect.* 2001; 109 Suppl 4: 547-51.
12. Ji JH, Jung JH, Kim SS, Yoon JU, Park JD, Choi BS, et al. Twenty-eight-day inhalation toxicity study of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhal Toxicol.* 2007; 19(10): 857-71.
13. Kim JS, Sung JH, Ji JH, Song KS, Lee JH, Kang CS, et al. In vivo genotoxicity of silver nanoparticles after 90-day silver nanoparticle inhalation exposure. *Saf Health Work.* 2011; 2(1): 34-8.
14. Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, Braydich-Stolle LK, Hess KL, Jones RL, et al. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *J Phys Chem B.* 2008; 112(43): 13608-19.
15. Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ, Hofmann MC. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol Sci.* 2005; 88(2): 412-9.
16. Hendi A. Silver nanoparticles mediate differential responses in some of liver and kidney functions during skin wound healing. *J King Saud Uni.* 2011; 23(1): 47-52.
17. Kim YS, Song MY, Park JD, Song KS, Ryu HR, Chung YH, et al. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Part Fibre Toxicol.* 2010; 7: 20.
18. Tang J, Xiong L, Wang S, Wang J, Liu L, Li J, et al. Distribution, translocation and accumulation of silver nanoparticles in rats. *J Nanosci Nanotechnol.* 2009; 9(8): 4924-32.
19. Chen X, Schluesener HJ. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicol Lett.* 2008; 176(1): 1-12.
20. Edwards-Jones V. The benefits of silver in hygiene, personal care and healthcare. *Lett Appl Microbiol.* 2009; 49(2): 147-52.
21. Ahmadi F. Impact of different levels of Silver Nanoparticles (Ag-NPs) on performance, oxidative enzymes, and blood parameters in broiler chicks. *Pak Vet J.* 2011; 32(3): 325-8.
22. Park EJ, Bae E, Yi J, Kim Y, Choi K, Lee SH, et al. Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2010; 30(2): 162-8.
23. Kvittek L, Vanickova M, Panacek A, Soukupova J, Dittrich M, Valentova E, et al. Initial study on the toxicity of silver nanoparticles (NPs) against *Paramecium caudatum*. *J Phys Chem C.* 2009; 113(11): 4296-300.
24. Greulich C, Braun D, Peetsch A, Diendorf J, Siebers B, Epple M, et al. The toxic effect of silver ions and silver nanoparticles towards bacteria and human cells occurs in the same concentration range. *RSC Adv.* 2012; 2(17): 6981-7.
25. Kim YS, Kim JS, Cho HS, Rha DS, Kim JM, Park JD, et al. Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhal Toxicol.* 2008; 20(6): 575-83.

26. Maneewattanapinyo P, Banlunara W, Thammacharoen C, Ekgasit S, Kaewamatawong T. An evaluation of acute toxicity of colloidal silver nanoparticles. *J Vet Med Sci*. 2011; 73(11): 417-23.
27. Sung JH, Ji JH, Park JD, Yoon JU, Kim DS, Jeon KS, et al. Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicol Sci*. 2009; 108(2): 452-61.
28. Kim S, Choi JE, Choi J, Chung KH, Park K, Yi J, et al. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol in vitro*. 2009; 23(6): 1076-84.
29. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*. 2007; 3(1): 95-101.
30. Rogers EJ, Hsieh SF, Organti N, Schmidt D, Bello D. A high throughput in vitro analytical approach to screen for oxidative stress potential exerted by nanomaterials using a biologically relevant matrix: human blood serum. *Toxicol in Vitro*. 2008; 22(6): 1639-47.
31. Tiwari DK, Jin T, Behari J. Dose-dependent in-vivo toxicity assessment of silver nanoparticle in Wistar rats. *Toxicol Mech Methods*. 2011; 21(1): 13-24.
32. Lovric J, Bazzi HS, Cuie Y, Fortin GR, Winnik FM, Maysinger D. Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots. *J Mol Med (Berl)*. 2005; 83(5): 377-85.
33. Dwivedi Pd, Misra A, Shanker R, Das M. Are nanomaterials a threat to the immune system? *Nanotoxicol*. 2009; 3(1): 19-26.
34. Portney NG, Ozkan M. Nano-oncology: drug delivery, imaging, and sensing. *Anal Bioanal Chem*. 2006; 384(3): 620-30.
35. Roshanai K, Razavian M. The effect of silver nano oral consumption on some hormonal, hematological and urine parameters of Wistar rats. *Qom Univ Med Sci J*. 2012; 6(3): 65-70.
36. Pisanic TR, 2nd, Blackwell JD, Shubayev VI, Finones RR, Jin S. Nanotoxicity of iron oxide nanoparticle internalization in growing neurons. *Biomaterials*. 2007; 28(16): 2572-81.
37. Zamani N, Naghsh N, Fathpour H. Comparing poisonous effects of thioacetamide and silver nanoparticles on enzymic changes and liver tissue in Syrian mice. *Zahedan J Res Med Sci*. 2013; 16(2): 54-7.
38. Sardari RRR, Zarchi SR, Talebi A, Nasri S, Imani S, Khoradmehr A, et al. Toxicological effects of silver nanoparticles in rats. *Afr J Microbiol Res*. 2010; 6(27): 5587-93.
39. Dziendzikowska K, Gromadzka-Ostrowska J, Lankoff A, Oczkowski M, Krawczynska A, Chwastowska J, et al. Time-dependent biodistribution and excretion of silver nanoparticles in male Wistar rats. *J Appl Toxicol*. 2012; 32(11): 920-8.
40. Hsin YH, Chen CF, Huang S, Shih TS, Lai PS, Chueh PJ. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicol Lett*. 2008; 179(3): 130-9.
41. Daniel SK, Tharmaraj V, Sironmam TA, Pithumani K. Toxicity and immunological activity of silver nanoparticles. *Appl Clay Sci*. 2010; 48(4): 547-51.

A survey of acute histopathological effects of silver nanoparticles on liver, kidney with blood cells during oral administration in male mice (Mus musculus)

Jafarzadeh Samani R¹, Heydarnejad MS^{1*}, Kabiri Samani M²

¹Biology Dept., University of Shahrekord, Shahrekord, I.R. Iran; ²Physiology Dept., University of Shahrekord, Shahrekord, I.R. Iran; ³Internal Medicine Dept., Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran.

Received: 19/Nov/2014 Accepted: 9/Mar/2015

Background and aims: Nowadays, with increasing use of silver nanoparticles in various products including consumption and medical appliances, it is necessary to consider toxicity of these nanoparticles for their safety issues. This study was designed and performed to investigate the silver nanoparticles acute histopathological effects on liver, kidney with blood cells during oral administration in male mice (*Mus musculus*).

Methods: In this experimental study, a group of 45 male BALB/c mice (weighting 24.2 ± 3.0 g) were randomly divided into three groups (two treatments and one control), each with 15 mice. Daily and at the same time, two silver nanoparticle groups were orally administered with 20 ppm and 50 ppm, but in control group, instead of silver nanoparticles, distilled water was used. Sampling was conducted on days 2, 7 and 14 of the experiment from the liver and kidney. With considering the blood cells, Hematoxylin and Eosin (H&E) staining protocol was used to pathological study of the specimens.

Results: The liver injuries were vacuolated of cytoplasm, degeneration and cell necrosis accompanied with focal accumulation of swelling cells and congestion. Glomerulonephritis, tubular cell necrosis, presence of swelling cells with congestion were observed in the kidney. The results showed that orally-administered silver nanoparticles at high dose of 50 ppm can cause damage to hepatic and renal tissues. There were no significant differences between red blood cell counts, hemoglobin and hematocrit ($P > 0.05$). However, white blood cell counts were significantly higher in treated groups with silver nanoparticles (50 ppm) compared with the control ($P < 0.05$).

Conclusions: This study showed that liver and kidney are target organs for silver nanoparticles. Silver nanoparticles damage the mice's liver and kidney, if eaten orally. Furthermore, orally-administered silver nanoparticles lead to considerable changes in white blood cell counts.

Keywords: Nanosilver, Histology, Liver tissue, Kidney tissue, Blood cells.

Cite this article as: Jafarzadeh Samani R, Heydarnejad MS, Kabiri Samani M. A survey of acute histopathological effects of silver nanoparticles on liver, kidney with blood cells during oral administration in male mice (*Mus musculus*). J Shahrekord Univ Med Sci. 2015; 17(4): 97-107.

***Corresponding author:**

Biology Dept., University of Shahrekord, Shahrekord, I.R. Iran, Tel: 00989173083810,
E-mail: m_heydarnejad@yahoo.com